

**Contratto di ricerca finanziato per lo svolgimento delle attività dell'azione C2 (Propagazione in vitro) nell'ambito del PROGETTO LIFE 15 NAT/IT/000946 FLORANET "Safeguard and valorization of the plant species of EU interest in the Natural Parks of the Abruzzo Apennine" in favore del Beneficiario Coordinatore del Progetto**

**Relazione delle attività - 3 ottobre 2018**

*Programma di ricerca (Allegato A del contratto)*

Presso la Banca del Germoplasma della Tuscia saranno condotte prove sperimentali di propagazione in vitro del materiale vegetale ottenuto da semi e/o piantine raccolte in natura delle seguenti specie target del progetto LIFE15 NAT/IT/000946 "FLORANET": *Cypripedium calceolus* L., *Adonis distorta* Ten., *Androsace mathildae* Levier e *Jacobaea vulgaris* Gaertn. subsp. *gotlandica* (Neuman) B.Nord., per le quali non è certa la riuscita della riproduzione da seme. In particolare:

- Lo studio e applicazione di protocolli di micropropagazione del materiale vegetale ottenuto da semi e/o piantine raccolte in natura delle specie target;
- La micropropagazione delle specie target da materiale vegetale idoneo, consegnato dagli operatori dell'Ente per le stagioni 2017 e 2018, che dovrà essere svolta nel periodo aprile – dicembre per le annualità 2017-2018;
- La propagazione in vitro di almeno 200 piantine ciascuna delle suddette specie.

*Attività svolte*

Nel periodo aprile-ottobre 2018 sono state condotte varie prove sperimentali di propagazione *in vitro* di 3 delle specie target previste dall'azione C2.

***Cypripedium calceolus***

*Cypripedium calceolus* è un'orchidea particolarmente difficile da riprodurre utilizzando semi maturi, mentre ci sono maggiori probabilità di successo utilizzando i semi ancora immaturi, che non hanno sviluppato la complessa dormienza fisica e morfofisiologica che subentra durante la maturazione. Per tale motivo, è stato richiesto al personale del Parco delle Majella di raccogliere e consegnare alla Banca del Germoplasma della Tuscia capsule immature di *Cypripedium calceolus* dalle popolazioni abruzzesi per intraprendere le prove di germinazione asimbiotica *in vitro*.

Sono quindi state allestite 2 tipologie di prove seminando semi immaturi (prelevati da capsule ancora verdi) e semi maturi, raccolti negli anni precedenti.

1. *Germinazione asimbiotica in vitro di semi immaturi*

Un totale di 8 capsule è stato raccolto da popolazioni nel Parco d'Abruzzo, Lazio e Molise in due momenti diversi (25/06/2018 e 01/08/2018).

Per la semina in sterilità di semi immaturi è stato seguito il protocollo di Magrini et al. (2012). Ogni capsula intatta è stata sterilizzata in una soluzione al 5% di ipoclorito di sodio per 5 min., seguita da 3 risciacqui con acqua distillata sterile. Successivamente, la capsula è stata sezionata con un bisturi in sterilità per il prelievo dei semi. I semi, naturalmente sterili, sono stati seminati, senza un ulteriore pretrattamento di scarificazione chimica, in un totale di 40 piastre Petri con terreno di coltura specifico *Malmgren Orchid Medium* modificato con l'aggiunta 400 mg/l di caseina idrolizzata, 20 g/l di

citochinine (pineapple powder), 1 g/l di carbone attivo oltre allo 0.6% di agar. Le piastre, in 5 repliche, sono state poste in incubatore a +25°C al buio (Malmgren, 1996).

- Capsule raccolte in loc. Camosciara (PNALM) il 25/06/2018: al momento dell'apertura è stato osservato che i semi delle 3 capsule erano troppo immaturi, con embrione appena accennato. Sono stati comunque seminati tutti, ma ad oggi non hanno dato alcun risultato.
- Capsule raccolte in loc. La Liscia e presso il Torrente Scerto (PNALM) il 01/08/2018: al momento dell'apertura è stato osservato che la maggior parte dei semi delle 5 capsule erano già maturi (scuri). Sono stati comunque seminati tutti i semi di tutte le capsule. Ad oggi è stata osservata la germinazione dei semi di 4 delle 5 capsule anche se solo per 2 capsule si stanno registrando dei buoni risultati. **A 2 mesi dalla semina sono germinati oltre 100 semi da cui si sono sviluppati piccoli protocormi (< 2mm), ma il processo è solo all'inizio e si prevede che questo numero continuerà ad aumentare.**

•

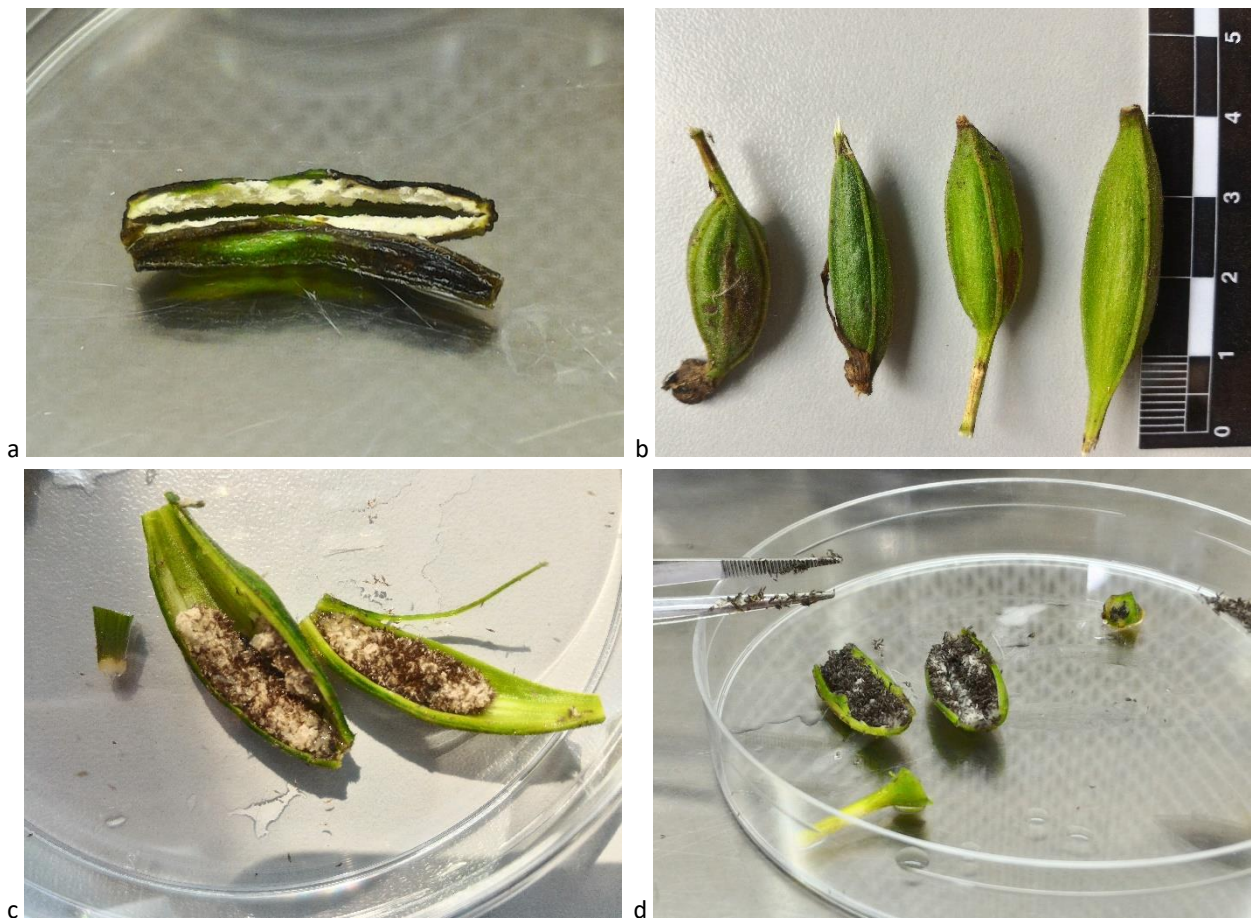


Fig.1. Prove di germinazione asimbiotica *in vitro* di semi immaturi di *Cypripedium calceolus*: a) capsula raccolta in loc. Camosciara (PNALM) il 25/06/2018 aperta in sterilità con visibili all'interno semi bianchi troppo immaturi. b) Capsule raccolte presso il Torrente Scerto (PNALM) il 01/08/2018, c) capsule aperte in sterilità con visibili all'interno semi bianchi immaturi insieme a semi neri già maturi e d) capsula con la maggior parte dei semi neri.

## 2. Germinazione asimbiotica *in vitro* di semi maturi

Semi maturi raccolti nel Parco della Majella nel 2014 e nel PNALM nel 2017 sono stati sterilizzati/scarificati con 2 soluzioni di ipoclorito di sodio con diverse concentrazioni (0.01% e 2%) + Tween 80, fino a sbiancamento, per rompere la dormienza; poi lavati per 3 volte con acqua distillata sterile e seminati in piastre Petri con terreno di coltura *Malmgren Orchid Medium*

modificato con l'aggiunta 400 mg/l di caseina idrolizzata, 20 g/l di citochinine (pineapple powder), 1 g/l di carbone attivo oltre allo 0.6% di agar. Le piastre, in 10 repliche, sono state poste in incubatore a +25°C al buio (Malmgren, 1996). A due mesi dalla semina queste prove non hanno dato alcun risultato.

Sia protocormi che foglie saranno utilizzati per la micropropagazione secondo i protocolli seguenti:

1. Protocormi di dimensioni >5mm saranno sezionati e posti su terreno specifico: 1/4 MS, 1 mg/l di IAA, 0.25 mg/l di BAP, 3% saccarosio e 0.7 % di agar, con pH 6.0; le colture saranno incubate al buio a T = 22°C (Sokolsky et al. 1997).
2. Le foglie delle plantule saranno tagliate orizzontalmente (0.5 cm) e poste su terreno MS con 1 mg/L di IAA, 2 mg/L di BAP, 3% saccarosio e 0.8 % di agar, con pH 5.6; e colture saranno incubate a T = 25°C con fotoperiodo 12/12 h (Deb & Pongener, 2013).

### *Adonis distorta*

Il Parco delle Majella il 27/06/2018 ha fornito 4 piante raccolte in natura. Queste sono state coltivate in laboratorio per ottenere materiale vegetale per la micropropagazione. In particolare:

1. L'unico piccolo rizoma presente è stato trattato con gibberelline per stimolare lo sviluppo di shoot-tips.
2. Dalle foglie e dai loro peduncoli sono state ottenute oltre 400 talee.

Per la micropropagazione le talee di foglie, sono state sterilizzate in una soluzione al 50% di Plant Preservative Mixture (PPM) per 30 min e poste su 6 diversi terreni di coltura realizzati con Murashige and Skoog (MS) come base, con diverse combinazioni di auxine e citochinine. Le piastre multiwell da 25 pozzetti sono state incubate a T = 25°C, con fotoperiodo 12/12 h.

Ad oggi le prove fatte non hanno ancora dato risultati.

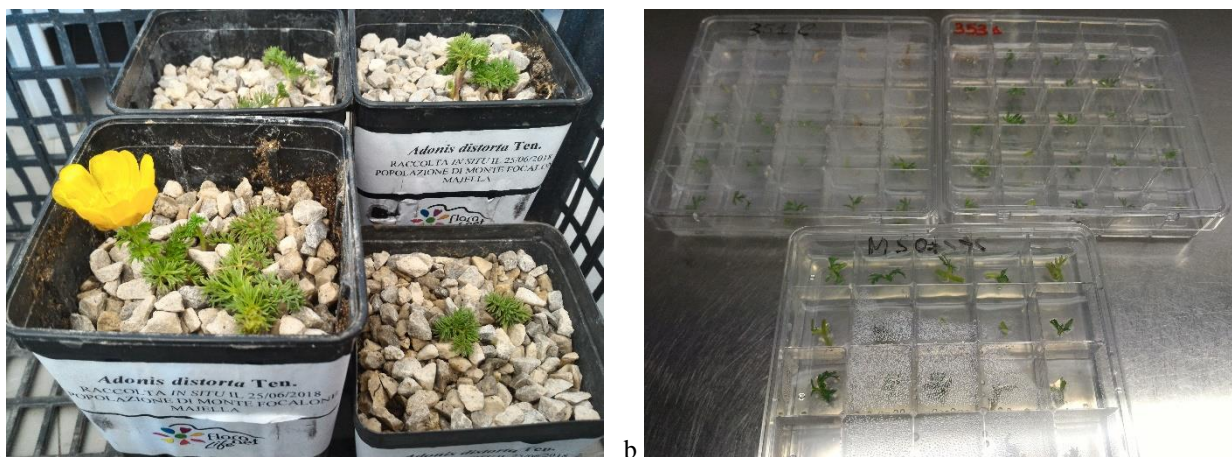


Fig. 2. Prove di micropropagazione di *Adonis distorta* da foglie: a) le piante raccolte in situ, b) talee poste in piastre multiwell da 25 pozzetti con terreni diversi.

Parallelamente sono state allestite prove di germinazione con semi forniti dal Parco, modificando i protocolli precedentemente testati che non avevano dato buoni risultati, soprattutto dal punto di vista dell'inquinamento delle piastre.

I semi senza pericarpo sono stati sterilizzati in una soluzione al 50% di Plant Preservative Mixture (PPM) per 24h, poi sono stati immersi per 24h in una soluzione con 250 mg/l di gibberelline. Successivamente sono stati seminati su due terreni di coltura diversi:

1. un terreno composto da acqua con 1% di agar e con 250 mg/l di gibberelline
2. BM-1 Terrestrial Orchid Medium con 0.6% di agar e 0.1% di carbone attivo

Le piastre, 3 repliche per ogni terreno, sono state poste al buio a  $T = +3^{\circ}\text{C}$  per 1 mese, per la stratificazione fredda umida. Successivamente, saranno poste a  $T = 22^{\circ}\text{C}$ . Sta per finire il periodo di stratificazione fredda, quindi non ci sono ancora risultati.

### ***Androsace mathildae***

Prove preliminari condotte nel 2017 hanno dato buoni risultati di germinazione sul terreno BM-1 Terrestrial Orchid Medium con 0.6% di agar e 0.1% di carbone attivo, con una germinazione dell'80%. Pertanto, nel mese di maggio sono state allestite altre prove di germinazione con circa 200 semi. Oltre al BM-1 è stato utilizzato un secondo terreno di coltura, Knudson C Orchid medium, due terreni di coltura che differiscono essenzialmente per la fonte di azoto, solo organico nel primo e solo inorganico nel secondo. I semi sono stati sterilizzati in una soluzione al 5% di ipoclorito di sodio, poi sono stati immersi per 24h in una soluzione con 250 mg/l di gibberelline. Successivamente sono stati seminati sui due diversi terreni di coltura. Le piastre, 5 repliche per ogni terreno, sono state poste al buio a  $T = +5^{\circ}\text{C}$  per 4 mesi, per la stratificazione fredda umida. Successivamente, sono state poste a  $T = 22^{\circ}\text{C}$ . Le piastre hanno appena finito il periodo di stratificazione fredda, quindi non ci sono ancora risultati.

Con le plantule ottenute dalle prove preliminari è stato possibile iniziare a testare il protocollo di Fasciani & Pace (2015) per la micropropagazione da foglie cotiledonari. Talee sono state poste su MS medium con 0.5 mg/l di BAP e 0.25 mg/l di IAA per indurre la differenziazione cellulare e il callo (Fasciani & Pace, 2015) e incubate a  $T = 22^{\circ}\text{C}$  con fotoperiodo 14/10h.

### ***Bibliografia***

DEB C.R., PONGENER A., 2013. *In vitro* regenerative competence of foliar explants of *Cymbidium aloifolium* (L.) Sw., *C. iridioides* D.Don: two horticultural important orchids. Indian J. Biotechnology 12: 402-408.

FASCIANI P., PACE L., 2015. Conservation of endangered species: *Androsace mathildae* Levier (Primulaceae) in central Italy. Am. J. Plant Sci. 6: 3175-3186.

MAGRINI S., BRONZO F., ONOFRI S., SCOPPOLA A., 2012. Germinazione asimbiotica *in vitro* di semi immaturi di *Orchis palustris* Jacq. Studi Trentini di Scienze Naturali 90: 159-164.

MALMGREN S., 1996. Orchid propagation: theory and practice. In: Allen C. (Ed.), North American native terrestrial orchids: propagation and production.

SOKOLSKY K., DOVHOLUK A., DOVHOLUK L., FALETRA P., 1997. Axenic seed culture and micropropagation of *Cypripedium reginae*. Selbyana, 18 (2): 172-182.